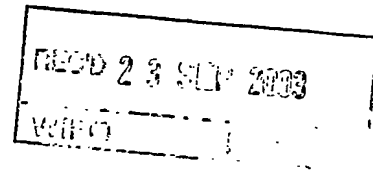


PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Patentavdelningen

**Intyg
Certificate**



Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.



- (71) *Sökande* *Genovis AB, Lund SE*
 Applicant (s)
- (21) *Patentansökningsnummer* *0202725-8*
 Patent application number
- (86) *Ingivningsdatum* *2002-09-12*
 Date of filing

Stockholm, 2003-09-15

*För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office*


Gunilla Larsson

*Avgift
Fee*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

ANORDNING FÖR MAGNETISKT INDUCERBAR MEMBRANTRANSPORT

Ink. t. Patent- och reg.verket

2002 -09- 1 2

Huvudfaxen Kassan

SAMMANDRAG

Föreliggande uppfinning hänför sig till en anordning innehållande magnetiskt påverkbart material avsedd för transport av substanser genom biologiska membran.

UPPFINNINGENS BAKGRUND

En biologisk cell vare sig det är en humancell, en bakterie eller en annan typ av cell omsluts av ett cellmembran. Detta membran är ofta uppbyggt av ett dubbel lager av fosfolipider. Lipidernas mer hydrofoba delar bildar det inre av membranet medan de hydrofila delarna vänds in mot cellens inre respektive ut mot omgivningen. Vidare innehåller cellmembranen en mängd olika proteiner. Olika typer av proteiner i membranet har olika praktiska uppgifter av betydelse för cellens livscykel. En del proteiner fungerar som transportkanaler för olika typer av joner och mindre metaboliter. Andra protein, receptorer, ger membranet egenskaper som gör att olika biokemiska signaler från omvärlden registreras av cellen. Membranet är cellens skydd mot omgivningen och det utför en selektiv kontroll av transportflödet av molekyler till och från cellen.

För att tvinga en viss mottagarcell att släppa in en molekyl, som cellen i normala fall inte släpper in, använder forskare en mängd olika metoder. Molekyler som inte är för stora kan modifieras och maskeras så att det liknar en molekyl som cellen automatiskt släpper in. För större molekyler som proteiner och DNA molekyler används antingen fysiska metoder som öppnar cellmembranet eller så utnyttjas viruspartiklar. Ett virus kan bära med sig relativt stora DNA molekyler. Viruset känner igen en viss typ av celler och kan skicka in den DNA molekyl som den bär på in genom cellmembranet. Då virus i sig är en potentiell fara för laboratoriepersonal har nya virusliknande partiklar tillverkats av liposomer för att försöka efterlikna virusets förmåga att föra in DNA. Vidare har befintliga virus modifierats för att minska risken för hantering i laboratiemiljö. Fysisk behandling av celler som elektrisk chock, värme chock eller med s.k. gene bombardment (genkanon på svenska) förstör eller vidgar cellmembranet temporärt och membranet blir tillfälligt öppet för inflöde av en större molekyl. De fysiska metoderna är inte specifika utan träffar alla celler i ett prov. Vidare är det

vanligt att dessa metoder dödar en mängd celler. För att införa DNA eller protein material i en enda cell med stor precision kan mikroinjektion under mikroskop vara ett alternativ, men endast en cell i taget kan behandlas. Utvecklingen av nya teknologier för införandet av DNA i celler har under det sista decenniet accelererat i takt med att kunskapen om våra arvsanlag har ökat. Utvecklingen av s.k. stamceller och andra cellinjer där cellerna inte delar sig särskilt ofta eller inte alls har ökat behovet av metoder som kan föra in DNA inte bara genom ett cellmembran utan även genom cellkärnans membran så att DNA molekylen når ända in i cellkärnan.

Vi har tidigare (1) beskrivit en ny metod för påverkan av cellmembran. Metoden kallad magnetoporering utnyttjar ferromagnetiska partiklar. Dessa partiklar har en diameter på 1-100 nm. Partiklarna kan genom att dess yta modifieras förmås att binda fast vid ett cellmembran. Därefter utsätts cell och partikelkomplexen för ett alternerande magnetfält. De ferromagnetiska partiklarna avger då värme samt vibrerar en aning. Cellmembranet blir mer permeabelt i partikelnas närhet och molekyler som t.ex. DNA kan diffundera in genom membranet. Alternativt kan hela partikeln penetrera membranet.

Föreliggande patentansökan beskriver den ovan nämnda ferromagnetiska partikeln som en anordning för transport av en molekyl genom ett eller flera membran utan att denna anordning nödvändigtvis själv transporteras genom membranet.

För närvarande finns magnetiskt påverkbara partiklar, i storleksordningen tio nanometer upp till några mikrometer, med modifierade ytor kommersiellt tillgängliga för olika ändamål, såsom kontrastmedel för MRI (magnetic resonance imaging) (2), preparering av RNA (ribonucleic acid) och DNA (deoxyribonucleic acid) (3), syntes av cDNA-bibliotek på fast fas (4), proteimupprening (5), bärare i immunologiska analyser (6), markörer inom immunologiska analyser (7), jonbytar- och affinitetskromatografi samt upprening eller sortering av celler, virus och organeller (8).

Huvudkomponenten i kommersiellt tillgängliga magnetiskt påverkbara partiklar utgörs oftast av ferrit/magnetit, en speciell typ av järnoxid som har magnetiska egenskaper d v s dess relativa magnetiska permeabilitet är mycket stor. Partiklarna innehåller en kärna av järnoxid och/eller järnoxidhydroxid och ibland ytterligare en eller flera metaller och dess oxider. Dessa paramagnetiska kärnor är inte permanenta magneter i sig själv men om de magnetiska

domänerna inuti varje partikels kärna utsätts för ett magnetfält försöker de ställa in sig efter fältets riktning (11). När fältets inverkan avtar förlorar de magnetiska domänerna så småningom sin riktning. Utsätts de paramagnetiska partiklarna för ett magnetiskt fält som ändrar riktning med en frekvens i storleksordningen 1 MHz kommer partiklarna att vid varje byte av riktning på fältet bära en initial motkraft mot fältriiktningen innan de magnetiska domänerna byter riktning. Detta fenomen som schematiskt förklaras ovan kan härledas ur hystereres kurvan för ferromagnetiska material och resulterar i en energiförlust märkbar i form av en värme utveckling från partiklarna.

Varje kärna kan bestå av en magnetisk domän eller ett flertal domäner som via aggregation bildat ett något större komplex. Flertalet av de kommersiellt tillgängliga partiklarnas kärnor består av mer än en magnetisk domän. Storleken på partikeln kärna avgör om det är möjligt att snabbt och enkelt separera ut de magnetiska partiklarna från en heterogen mix med ett magnetiskt fält (ofta en enkel permanent magnet). För samtliga applikationer av magnetiska partiklar som innebär en upprening eller en sortering av en specifik komponent ur en mängd andra komponenter är detta mycket praktiskt och dessa partiklar har ofta en diameter större än 200 nm. För den partikel som beskrivs i denna ansökan är det dock viktigt att den är så liten att den inte sedimenterar av gravitationskraften och att den inte aggregerar med närliggande partiklar och bildar större komplex vid förvaring av sagda partikel i en vattenbaserad suspension. Vidare är det av största vikt att partikeln som beskrivs i denna ansökan går att hantera utan att tillföra en målcell infektion av något slag. Anordningen måste därför utan svårighet passera ett sterilfilter med storleken 100-200 nm. Partiklarna beskrivna i denna ansökan bildar således en stabil ferrofluid (9), dvs en stabil kolloidial suspension av ferromagnetiska partiklar. Detta medför att partiklarna håller sig i suspensionen och att de genom diffusion kan förflytta sig i en cellsuspension och finna sitt mål.

Kärnan i kommersiellt tillgängliga partiklar är ofta innesluten i eller uppblandad med en polymer, såsom dextran eller protein, eller omgiven av ett yttre monolager eller bilager av amfifatiska molekyler, såsom fettsyror eller derivat därav. Detta yttre hölje motverkar aggregation av närliggande kärnor som annars kan inträffa. Det yttre höljet underlättar vidare utbyggnad av partikeln och har använts för kemisk inkoppling av andra molekyler, exempelvis receptorer, lektiner, enzym och antikroppar, till ytan på de magnetiskt påverkbara partiklarna, varvid de erhåller selektivt bindande egenskaper. De bindande egenskaperna förmår partikeln att binda fast vid ett målobjekt. För den anordning som beskrivs i denna

patentansökan är det av stor vikt att partiklarna inte aggregerar eftersom storleken på varje partikel måste vara i storleksordningen 1-200 nm för att partiklarna skall hållas stabilt i en suspension och inte sedimentera samt vara enkla att sterilfiltrera i de fall detta är önskvärt. Ett yttre hölje som motverkar aggregation är således nödvändigt. Samtidigt är det viktigt att den värme som avges från anordningens kärna når ut i omgivningen. Denna motsättning har i föreliggande patentansökan lösts med en anordning bestående av en partikel uppbyggd av en kärna som inte är uppblandad eller omgiven av polymer och ej heller täckt med ett mono- eller bilager av amfipatiska molekyler utan en kärna producerad i ett vattenbaserat system (9). Kärnan stabiliseras på två olika sätt beroende på vilken typ av molekyl som skall kopplas till partikeln och där utgöra den selektivt bindande och effektorbärande delen av anordningen (se nedan). Antingen stabiliseras kärnan av denna molekyl direkt via van der Waals bindningar till metall oxid/hydroxid kärnan eller av en mindre molekyl exemplifierat av en organisk silaniserad molekyl, bärnstensyra och dess derivat eller en aminosyra. Till denna mindre molekyl kopplas sedan den selektivt bindande och effektorbärande molekylen kovalent.

Ett ytterligare krav på den i denna patentansökan beskrivna anordningen är att den skall kunna föra med sig en molekyl till sitt mål. Denna molekyl kan i princip vara vilken molekyl som helst men exemplifieras av DNA, RNA och proteiner och benämns här för effektermolekyl. Vidare måste denna effektermolekyl, enhet III i figur 1A, vara lokaliserad i den selektivt bindande molekylen, enhet II i figur 1A, närhet på sagda anordnings kärna, enhet I i figur 1A. Därför måste den selektivt bindande molekylen och den effektorbärande molekylen antingen vara en och samma molekyl det vill säga inneha båda egenskaperna eller så kopplas två enheter ihop kemiskt eller via genetisk fusion till en enda molekyl. Detta för att placera sagda effektermolekyl intill den punkt på membranet, enhet IV i figur 1B, där den selektiva molekylen bundit fast, se figur 1B. Denna punkt på membranet är den enda givna punkten där membranet kommer att reagera för värmen och vibrationen från anordningen då denna i sin tur utsätts för ett alternerande magnetfält. Den tillfälliga por som då uppstår i membranet samt den ökande lokala diffusionen till följd av värmeutvecklingen förmår sagda effektermolekyl att diffundera in genom membranet även om inte hela anordningen följer med genom membranet. Denna effekt är mycket viktig då man inte vill föra in hela anordningen genom ett membran till exempel för att inte störa en levande cell eller cellkärna mer än nödvändigt. Denna konstruktion gör vidare anordningen unik bland tidigare beskrivna paramagnetiska partiklar (9-16). Genom att välja hur effektermolekylen binds fast vid partikeln samt välja frekvens, fältstyrka, längd på pulsen och antal pulser från det alternerande fältet kan

transporten genom membran med eller utan hela partikeln regleras. En bindning med högre styrka exemplifierat av en affinitetsbindning leder med större sannolikhet till transport av hela anordningen genom membranet medan en elektrostatisk bindning eller en van der Waals bindning ökar möjligheten till att reglera membrantransporten så att endast effektormolekylen transporteras genom membranet.

Det är sedan tidigare känt (10) hur en superparamagnetisk partikel i storleksordningen 3 till 1000 nm bestående av en kärna av järnoxid omgiven av en organisk molekyl till vilken en mängd olika molekyler kan kopplas fast kan tillverkas för olika ändamål. I patentet (10) beskrivs vidare hur denna typ av partiklar kan användas som tumör destruktiva agenter, för att öka ett immunsvaret för en molekyl kopplad till dess yta, för att med hjälp av en permanent magnet eller elektromagnetiskt fält dirigera en viss läkemedelssubstans till ett målorgan, för upprening av fusionerade celler, för upprening av celler som tagit in genmaterial fäst på partikeln, som kontrastmedel, för *in vitro* diagnostik och som magnetiska bärare eller adsorbenter. Oavsett användning och oavsett hur många molekyler som kopplas till denna partikels yta beskrivs inte hur dessa molekyler är orienterade i förhållande till varandra, vilket gör partikeln i föreliggande patentansökan unik. Vidare beskrivs det inte i nämnda patenthandling (10) hur partikeln skall utformas för användning för membrantransport i ett alternerande magnetfält.

Vidare är det sedan tidigare beskrivet (11) en partikel i nanostorlek täckt med ett derivat av bärnstenssyra kopplad i ett andra steg till annexin utformad för märkning av molekyler eller celler med sagda magnetpartiklar. Föreliggande patentansökan beskriver en partikel på vars yta det minst finns två unika egenskaper en specifik inbördes placering på partikeln vilket är unikt.

Bahr et al (12) beskriver en partikel uppbyggd av en järnoxid kärna omgiven av ett biokompatibelt substrat till vilket olika effektor molekyler kan kopplas till vilka i sin tur biomolekyler kopplas via kovalenta bindningar. Partikeln i föreliggande ansökan har ett minimalt lager av molekyler utanför kärnan för dess specifika användning och skiljer sig därför väsentligt från den av Bahr et al beskrivna partikeln.

Det är sedan tidigare känt (17) att partiklar i nanostorlek kan utryttjas för att döda tumörceller genom upphettning i ett alternerande elektromagnetiskt fält så kallad hypertermi. Partiklarna för detta ändamål modifieras med ett stabiliserande hölje och en igenkänningsmolekyl för en

specifik målcell. Cell-partikel komplexet placeras i ett alternerande fält tills värmen i de attackerade målcellerna blir så hög att cellen dör. Denna applikation har för avsikt att med hjälp av värme helt slå ut en cell. I den föreliggande patentansökan beskrivs en anordning som kan utnyttja värmen från den magnetiskt påverkbara kärnan för ett helt annat ändamål, membran transport, utan att påverka hela cellen med en generell höjning av temperaturen.

I de fall effektormolekylens mål är en organell inuti en cell krävs passage genom mer än ett membran. En variant av beskrivna anordning omgärdas av ett lipidhölje som bildar en liposom. Denna magnetoliposom tillåts i ett första steg att fusera med cellmembranet. I nästa steg tillåts anordningen utan liposomhölje inuti cellen att söka upp målmembranet exemplifierat av cellkärnans membran varefter cellen utsätts en eller upprepade gånger för ett alternerande magnetfält. Detta utförande av anordningen är särskilt viktigt vid införandet av DNA till cellkärnan i levande celler som inte delar sig.

Magnetoliposomer för målspecifik behandling av biologiskt material har beskrivits i patentlitteraturen (13, 14). Den magnetiska delen av dessa liposomer utnyttjas för att med hjälp av ett magnetfält dirigera liposomen till rätt målobjekt, vilket skiljer sig från föreliggande uppfinning där liposomen transporterar den aktiva magnetpartikeln genom ett yttre cellmembran varefter den magnetiska partikeln utnyttjas för ytterligare en membrantransport via ett alternerande magnetfält. Magneto fluorescerande liposomer beskrivs av Radbruch (14) för specifik märkning av celler vid cellsortering vilket inte är relevant för föreliggande ansökan.

KORT SAMMANFATTNING AV UPPFINNINGEN

Uppfinningen avser en anordning avsedd för magnetfältsinducerad membrantransport av substanser. Anordningen innehåller dels en magnetiskt påverkbar komponent och dels en membranbindade komponent som samtidigt också utgör en substansbindande komponent. Företrädesvis är partiklarnas diameter större än 1 nm och mindre än 1 mikrometer.

I en utföringsform av anordningen innehåller nämnda magnetiskt påverkbara komponenten minst en metall eller ett derivat därav, såsom en oxid.

I ytterligare en utföringsform av anordningen kan nämnda anordnings membrantransport påverkan induceras genom ett pålagt alternerande magnetfält med en

svängningsfrekvens inom intervallet 10 Hz till 100 MHz samt en fältstyrka inom intervallet 1 till 1000 Oerstedt.

I alternativa utföringsformer av anordningen innehåller den även indikatorämnen och/eller en dubbellager membrankomponent som bildar en liposom struktur.

Anordningen enligt föreliggande uppfinning kan användas för biokemiskt arbete vid analys, preparation och forskning i laboratorier. Anordningens effekt kan ytterliggare förstärkas genom ett förfarande där en suspension av anordningen först blandas med membranomslutna strukturer och tillåts inkubera under 1 min till 3 timmar före det att det bildade partikel-membrankomplexet utsätts för ett alternerande magnetfält.

DETALJERAD BESKRIVNING AV UPPFINNINGEN

Den patentansökta anordningen kännetecknas av två komponenter. Den ena är en magnetiskt påverkbar kärna och den andra är en molekyl med två egenskaper i en och samma molekyl, dvs en difunktionell molekyl. Egenskaperna som sagda molekyl definieras av är dess förmåga att specifikt känna igen ett målobjekt och binda fast vid detta och det andra är att attrahera en effektor-molekyl så att denna effektor-molekyl transporteras med den patentsökta anordningen.

Den magnetiskt påverkbara kärnan kan bestå av järnoxider och järnoxidhydroxider eller blandningar därav samt kan innehålla oxider av andra metaller så som Co, Ni, Mn, Be, Mg, Ca, Ba, Sr, Cu, Zn, Pt, Al, Cr, Bi, sällsynta jordartsmetaller eller blandningar därav. Kärnan har en storlek på mellan 1 och 100 nanometer och totalt har partikeln en diameter på mellan 1 nanometer och 1 mikrometer.

Den difunktionella molekylen kan vara ett protein, en peptid, ett hormon, en organisk molekyl, en DNA eller RNA molekyl som har en naturlig och stark affinitet för ett målobjekt. Sagda difunktionella molekyl kan exemplifieras av ett lektin och dess affinitet för kolhydrater på cellmembrans proteiner eller en antikropp och dess affinitet för ett visst antigen. Dessa protein molekyler innehåller ofta tillräckligt med laddningar för att kunna binda till sig en molekyl via elektrostatiske bindningar eller hydrofoba delar som kan binda till sig andra molekyler via van der Waals interaktioner. Det är vanligen inte denna förmåga molekylen är känd för och det är därför ofta inte dokumenterat. Vi har t.ex. upptäckt att lektinet Concanavalin A och kanin IgG molekyler binder plasmid DNA tillräckligt bra för att kunna

transportera det till ett kolhydrats innehållande cellmembran då det sitter bundet till en magnetiskt påverkbar partikel, se exempel IV nedan. Återfinns inte den divalenta funktionen i en molekyl kan den skapas genom kombinationer antingen kovalenta eller via genfusion mellan minst två olika molekyler eller delar därav. En tetra-lysin peptid fuserad till ett lektin ger lektinet ett DNA associerande säte, se exempel III nedan.

För den patentsökta anordningens applikation i membrantransport är det viktigt att kunna följa och dokumentera partikelns väg och lokalisering i eller utanför en cell. I ett utförande av anordningen binds därför en markör så som t ex ett färgämne, fluorescerande ämne, radioaktivt ämne, chemiluminiscerande ämne eller enzym fast vid den magnetiskt påverkbara kärnan. I ex II nedan beskrivs hur enzymet luciferase används för dokumentation av en variant av anordningen och dess förmåga att binda fast vid det yttre cellmembranet på *E.coli* bakterier.

I ett annat utförande av anordningen omges denna av ett fosfolipidlager vilket bildar en liposom kring den magnetiskt påverkbara kärnan och den därpå inbundna difunktionella molekylen. På detta sätt kan anordningen nå fram till en organell inuti en levande cell och transportera effektmolekylen in genom ett organellmembran exemplifierat av cellkärnans membran, mitokondrie membran eller chloroplast membran.

Tillverkningen av anordningen samt exempel på tillämpningen av anordningen i membran transport exemplifieras nedan närmare med följande ej begränsande exempel.

Exempel I. Tillverkningsprocedur för partiklar med ConA som difunktionell molekyl på ytan

En vattenbaserad slurry av aggregerade järnoxid kärnor framställdes enligt metod beskriven av Massart (10). Slurryn behandlades därefter med destillerat vatten pH 3.0 justerat med HCL (tvättlösning) under sonicering. Slurryn centrifugerades därefter (500g, 10 min), överlösningen dekanterades bort. Pelletten resuspenderades åter igen i tvättlösning och soniceringen åtföljd av centrifugering upprepades tills att partiklarna inte längre sedimenterade. Då höjdes g-talet för centrifugeringsteget succesivt i steg tills att partikel suspensionen var stabil utan att sedimentera under centrifugering i minst 1 h vid 22 000 g. Partiklarna sterilfiltrerades. Suspensionen (1%, 10 mg/ml) uppvisade en magnetisk permeabilitet om $\mu_r=1.9$. Järnhalten uppmättes till 49% med hjälp av atomadsorption. Denna suspension benämns FF1.

0,1 ml av FF1 späds 10 gånger i tvättlösning. En lösning av concanavalin A om 75 µg/ml i tvättlösning filtrerades genom en avsaltningskolonn (pharmacia) varefter 0.5 ml utsädd FF1 och 0.5 ml concanavalin A lösning blandades i ett provrör och tilläts inkuber 30 min i rumstemperatur på ett vippbord. 1 ml bovin serum albumin lösning (behandlat i likhet med concanavalin A ovan) om 250 µg/ml tillsattes provet för att täcka hela partikelytan med protein och detta inkuberades under 30 min vid rumstemperatur i 30 min. Till proverna tillsattes NaCl till en slutkoncentration av 0.5 M för att säkerställa att partiklarna var helt täckta av protein samt att pådriva van der Waals interaktionerna mellan järnoxid partiklarna och protein molekyler. Det slutliga provet gelfiltrerades mot PBS buffert för att ta bort överflödiga BSA molekyler och för att byta buffert. Slutligen sterilfiltrerades (0.2µm) ferrofluiden.

Exempel II. Visualisering av partiklarna genom märkning med luciferase

Partiklarna tillverkades enligt ovan men i detta fall blandades concanavalin A lösningen med luciferase (firefly) om 50 µg/ml.

Den färdiga luciferase/concanavalin A ferrofluiden späddes ut tills att den uppvisade $\mu_{-1.0020}$.

20 µl av utsädd ferrofluid enligt ovan tilläts inkubera med 10 µE.coli slurry (OD600=0.4, koncentrerad 10 gånger i PBS buffert) i 370 µl PBS buffert supplementerad med 1 mM CaCl₂ och 1 mM MnCl₂ (PBS2). Cell-ferrofluid suspension tilläts inkubera i 30 min varefter cellerna centrifugerades vid 3000 g i 5 min och tvättades 2 gånger i PBS2. Cell-partikel pelletten resuspenderades i 50 µl beetle luciferin substrat från PROMEGA Luciferase assay system tillsattes. Ljusintensiteten från luciferase bekräftade inbindning till cellerna dels i suspension och dels vid studier av cellerna i mikroskop.

Exempel III. Transfektion av *E.coli* LB121 med plasmid DNA pUC18 bundet till ConA-tetralysine

20 µl av en suspension enligt föreliggande uppfinring, där den cellbindande komponenten utgörs av conA vilken via genfusion uttryckts som ett protein (uttryckt i *E.coli*) med den substansbindande komponenten som utgörs av en syntetisk polylysin peptid (4aminosyror),

och där koncentrationen av den magnetiska påverkbara komponenten ger suspension med en magnetisk relativ permeabilitet om 1.002, tillsattes till 0.5 µg pUC18 plamid DNA i 10 µl PBS. Provet inkuberades i 20 min. 10 µl celler odlade till en celltäthet om OD (600 nm) = 0.4 koncentrerad 10 gånger och resuspenderad 0.1 M PBS buffert innehållande 0.15 M NaCl tillsattes ferrofluiden. Efter en inkubationstid om 30 minuter utsattes provet i 20 s för ett alternerande magnetiskt fält med en frekvens om 1 MHz och en fältstyrka på 100 Oe. 1ml sterilt LB- medium tillsattes varefter provet inkuberades i 45 min vid 37° C. 10 µl av provet spreds sedan ut på agarplattor (LB-medium, 75 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml samt 25 µg/ml X-gal). Plattorna inkuberades i 37° C över natt varefter transfektionsfrekvensen 2.5×10^7 kolonier / mg DNA uppmättes genom att räkna antalet blå kolonier/agarplatta.

Exempel IV. Transfektion av *E.coli* LB121 med plasmid DNA pUC18 med olika magnetiskt påverkbara partiklar-en jämförelse mellan olika difunktionella molekyler

20 µl av olika suspensioner av partiklar enligt föreliggande uppfinning, där den divalenta komponenten i respektive suspension utgörs av utgörs av antikropp riktad mot OmpA, concanavalin A, amino grupper och carboxylgrupper och där koncentrationen av den magnetiska påverkbara komponenten karaktäriserade suspensionen med en magnetisk relativ permeabilitet om 1.002, tillsattes till 0.5 µg pUC18 plasmid DNA. Provet inkuberades i 20 min och därefter tillsattes 10 µl celler odlade till en celltäthet om OD(600 nm) = 0.4 koncentrerad 10 gånger och resuspenderad 0.1 M PBS buffert innehållande 0.15 M NaCl.. Efter en inkubationstid om 30 minuter utsattes provet i 20 s för ett alternerande magnetiskt fält med en frekvens om 1 MHz och en fältstyrka på 100 Oe. 1ml sterilt LB- medium tillsattes varefter provet inkuberades i 45 min vid 37° C. 10 µl av provet spreds sedan ut på agarplattor (LB-medium, 75 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml samt 25 µg/ml X-gal). Plattorna inkuberades i 37° C över natt.

De olika suspensionerna resulterade i följande resultat:

Ferrofluid: Antal positiva kolonier per agarplatta:

Referens (prov utan ferrofluid)	1	1
ff-NH ₃ ⁺	6	
ff-COO ⁻	3	
ff-AntiOmpA	20	
ff-ConcanvalinA	97	

REFERENSER

1. Fredriksson S. and Kriz D. (2001) Device for introducing pores into biological materials. PCT/se00/01743 WO01/18168 A1.
2. Bulte J.W.M. and Brooks R. A. Magnetic nanoparticles as contrast agents for MR imaging : An overview. pp 527-544 in Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, edited by Häfeli U., Schutt W., Teller J. and Zborowski M. Plenum Press 1997.
3. DYNAL Inc, Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical handbook 3rd edition (1998) Chapter 2 (pp: 19-68).
4. Lambert K.N. and Williamson V.M. (1993) DNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. Nucleic. Acids res. 21 (775-776)
5. Karlsson G.B. and Platt F.M. (1991) Analysis and Isolation of Human transferring Receptor Using the OKT-9 Antibody Covalently Crosslinked to Magnetic Beads. Analytical Biochemistry, 199, pp:5433-5442.
6. Meza M. Application of Magnetic Particles in Immunoassays pp: 303-310 in Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, edited by Häfeli U., Schutt W., Teller J. and Zborowski M. Plenum Press 1997.
7. Larsson, K., Kriz, K. och Kriz, D. Magnetic transducers in Biosensors and Bioassays. Analysis, No.7, 1999.
8. Pretsvik W.S., Berge A., Mørk P.C., Stenstad P.M. and Ugelstad J. Preparation and application of monosized magnetic particles in selective cell separation, pp 11-35 in Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, edited by Häfeli U., Schutt W., Teller J. and Zborowski M. Plenum Press 1997.
9. Massart R. Magnetic fluids and process for obtaining them (1982) US Patent 4329241.
10. Pilgrim H. Superparamagnetic particles, process for their manufacture and usage (1999) US Patent 5928958.
11. Majetich S. Magnetization reversal in nanoparticles (1998), Advances in Metal and Semiconductor Clusters Vol. 4 pp35-65.
12. Halbreich A., Sabolovic D., Roger J., Pons J-E., Sestier C. and Geldwerth D. Magnetic nanoparticles coupled to annexine, and utilization thereof. Patent US6150181

PATENTKRAV

1. Anordning, för transport av substanser genom biologiska membran k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller minst ett magnetiskt påverkbart material samt minst en difunktionell molekyl med minst ett bindande säte för nämnda substans och med minst ett bindande säte för nämnda biologiska membran.

2. Anordning enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda magnetiskt påverkbara materialet innehåller järnoxid, järnoxidhydroxid, järnoxidhydrat, gamma-Fe₂O₃, Fe₃O₄, järnoxider innehållande metalljoner såsom Co, Ni, Mn, Be, Mg, Ca, Ba, Sr, Cu, Zn, Pt, Al, Cr, Bi, sällsynta jordartsmetaller eller blandningar därav.

3. Anordning enligt krav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda difunktionell molekyl är ett lektin såsom t ex Concanavalin A, transferrin, avidin, selektiner, DNA, RNA, antibiotika, hormoner, polyelektrolyter, antikroppar, antigen, syntetisk peptid, peptid, virusprotein, polylysin, DNA-polymeras, RNA-polymeras, ligas, exonukleaser, endonukleaser, zinkfingrar, repressorer eller promotorer.

4. Anordning enligt krav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda difunktionell molekyl är ett rekombinant fusionsprotein eller en fusionsmolekyl mellan minst två av följande enheter eller delar därav: lektin såsom t ex Concanavalin A, transferrin, avidin, selektiner, DNA, RNA, antibiotika, hormoner, polyelektrolyter, antikroppar, antigen, syntetisk peptid, peptid, virusprotein, polylysin, DNA-polymeras, RNA-polymeras, ligas, exonukleaser, endonukleaser, zinkfingrar, repressorer eller promotorer.

5. Anordning enligt krav 1, 2, 3 eller 4 k ä n n e t e c k n a d av att den är en partikel med genomsnittsdiameter inom intervallet 1 nm till 10 µm.

6. Anordning enligt krav 1, 2, 3, 4 eller 5 k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en indikator såsom t ex ett färgämne, fluorescerande ämne, radioaktivt ämne, chemiluminiscerande ämne eller enzym.

7. Anordning enligt krav 1, 2, 3, 4, 5 eller 6 k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en dubbellager membrankomponent som kan vara uppbyggd av t ex fosfolipider och/eller kolesterol.

8. Förfarande där anordningen enligt något av kraven 1-7 utnyttjas för membran transport av substanser såsom DNA, RNA, PNA, protein eller del därav, peptid, virus, polymerer, läkemedel samt steroider.

9. Förfarande där anordningen enligt något av kraven 1-7 i närvaro av ett alternerande magnetfält med en frekvens inom intervallet 10 Hz till 100 MHz samt en fältstyrka inom intervallet 1 till 1000 Oerstedt, utnyttjas för membran transport av substanser.

10. Förfarande där anordningen enligt något av kraven 1-7 utnyttjas för biokemiskt arbete såsom t ex transfektion, transformation, genöverföring, genuttryckskontroll, celldifferentierings kontroll, protein uttrycks kontroll, proteinsyntes, *in vivo* protein aktivitets mätning, genmodifiering av virus/protozoer/mögel/bakterier och/eller organeller däri/bakteriefager/växtceller/ och/eller organeller däri/mamaliceller/primärceller/stamceller.

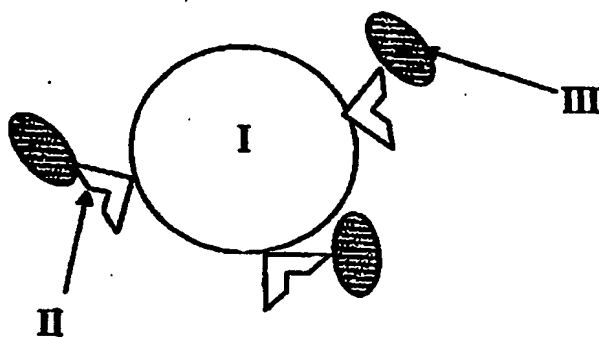
11. Förfarande där anordningen enligt något av kraven 1-7 blandas med membranomslutna strukturer och tillåts att inkubera under 1 minut till 3 timmar före det att det bildade partikel-membrankomplexet utsätts för ett alternerande magnetfält.

12. Förfarande där en membranomsluten anordning enligt krav 1-7 först tillåts fusera med ett cellmembran varefter de internaliserade partiklarna tillåts att inkubera under 1 minut till 48 timmar varefter cellerna innehållande partiklar utsätts, en eller upprepade gånger för ett alternerande magnetfält för membrantransport över ett intracellulärt membran exemplifierat av cellkärnans membran och/eller mitokondrie membran och /eller chloroplast membran.

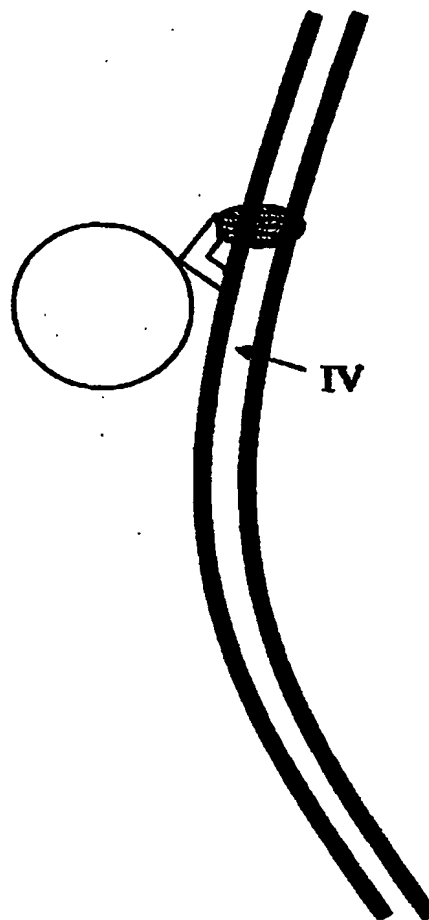
13. Förfarande där anordningen enligt något av kraven 1-7 används i en kombination av förfaranden enligt krav 8-11.

FIGUR 1.

A.



B.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.